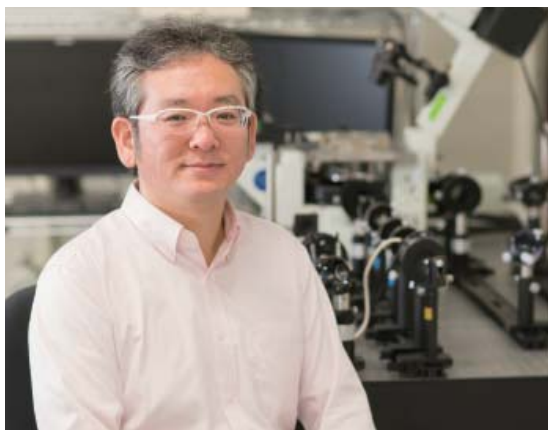




タンパク質分子モーターの動きを 高速・高精度に可視化する

飯野 亮太 岡崎統合バイオサイエンスセンター 教授

いいの・りょうた

1972年埼玉県生まれ。2000年名古屋大学大学院理学研究科単位取得退学。2003年博士（理学）取得。JST-ERATO研究員、大阪大学産業科学研究所特任助手、助手、助教、東京大学工学系研究科講師、准教授を経て2014年6月より現職。総合研究大学院大学教授兼任。専門は1分子生物物理学。タンパク質分子モーターのダイナミクスや構造を調べるだけでなく、天然に存在しない分子を創ることでその作動原理と設計原理を徹底的に理解したいと考えています。

はじめに

タンパク質でできた分子モーター（図1）は、化学エネルギーを力学エネルギーに変換して一方向性運動を行う分子機械であり、高いエネルギー変換効率等、優れた性能を発現する^[1]。このエネルギー変換の仕組みや、分子モーターを構成する部品間の協調の仕組みを徹底的に理解したい。我々はこの目的の一環として、金ナノ粒子、金ナノロッドといったプラズモニックナノプローブを分子モーターの1分子イメージングに利用している。本稿では、プラズモニックナノプローブの利点と欠点、およびプラズモニックナノプローブを用いた1分子イメージングの例について紹介する。

プラズモニックナノプローブの利点と欠点

光学顕微鏡を用いた生体1分子イメージングは、生体分子機械、なかでも生体分子モーターの運動素過程の可視化を目的として1990年代半ばに勃興し、我が国の研究者がその発展に大きく貢献してきた。生体1分子イメージングは分子モーターの作動機構やエネルギー変換機構の解明に寄与してきた

だけでなく、超解像蛍光顕微鏡（2014年ノーベル化学賞）、次世代DNAシーケンサーの基盤技術として産業応用にも展開されている。

生体1分子イメージングの可視化プローブとしてよく用いられているのは蛍光色素である。この「小さな」プローブは分子モーターの機能を阻害することなく標識できるという利点を持つ。一方、蛍光として得られるフォトン数がそれほど多くないため、計測の位置決定精度は数nm程度に限られ、時間分解能もサブ秒～ミリ秒程度に限られるという欠点を有している。我々はこれらの欠点を克服するため、大きさ数10nmの金ナノ粒子や金ナノロッドといったプラズモニックナノプローブを生体1分子イメージングに利用している^[2-7]。

プラズモニックナノプローブの最大の利点は、光を強く散乱するので蛍光色素に比べて圧倒的に高いフォトン数が得られる点である^[2]。このため、高い位置決定精度と時間分解能での1分子イメージングが可能となる。例えば金ナノ粒子は、プラズモン共鳴のピークに近い波長500-550nmの光を強く散乱する（ピークの位置は粒子のサイズや表面のコーティングの有無で変化

する）。我々の計測では、波長532nmのレーザーで照明した粒径40nmの金ナノ粒子の散乱像で、位置決定精度0.3nm、時間分解能100μsを達成している（未発表データ）。また、金ナノロッドにはさらなる利点がある。金ナノロッドは長軸と短軸でプラズモン共鳴の波長のピークが大きく異なるため、1）散乱光の偏光を直交する2成分に分けて検出する、2）焦点面から数μmデフォーカスした像を取得する、といった方法でその配向を決めることができる^[7]。特に後者では、ガラス基板に対する方位角だけでなく極角も測定可能であり、3次元的な配向を決めることができる。さらに金ナノプローブは、褪色することなくブリッキングも示さないで、安定したシグナルの長時間観察が可能となる。

一方、蛍光色素よりもサイズが大きいのがプラズモニックナノプローブの最大の欠点である。サイズを小さくすることもできるのだが、我々の計測によると散乱強度は粒径の4乗に比例するので（未発表データ）、シグナルが大幅に減少してしまう。尚、結合させる場所をきちんと選べば、大きなプローブでも分子モーターの動きの邪魔には

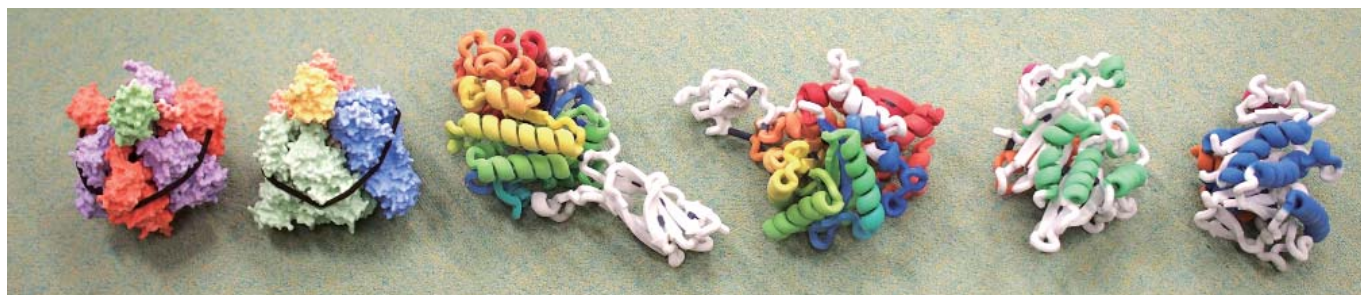


図1 我々が研究対象とする様々な分子モーターの模型。3Dプリンタを用い、分子研装置開発室で作製して頂いた。分子模型は、分子モーターへのプラズモニクナノプローブの結合位置を検討する上で非常に有用である。

ならないことを強調しておく。分子モーターの運動に影響を与える外力には慣性力、粘性力、弾性力、ランダム力が挙げられる。プラズモニクナノプローブの質量は十分に小さいので慣性力は実質無視できる。分子モーターが働く水中では慣性よりも粘性が支配的である。粘性力は速度に比例するが、分子モーターの運動でプラズモニクナノプローブにかかる粘性力は微々たるものである。弾性力はゴムのような弾性体に繋がれた場合には発生するが、水中で自由に動く場合は考慮する必要はない。結局、分子モーターの動きに最も影響するのは熱運動する水の衝突に

よるランダム力となる。ランダム力に方向性はないが、分子モーターのブラウン運動を引き起こす。プラズモニクナノプローブの結合によりブラウン運動の速度は数分の一に低下するが、タンパク質分子モーターの直進運動や回転運動の律速にはならない。

他方、分子モーターのどこにプラズモニクナノプローブを結合させるかはとても重要である。よい場所につけないと立体障害で動きを邪魔することになる。我々は、分子モーターの様々な位置に結合させて蛍光標識した試料と比較し、良い位置をスクリーニングしている。プラズモニクナノプロー

ブの他の欠点としては、分子モーターとの1:1標識が容易でなく、1つのプローブに複数の分子が結合してしまう可能性が挙げられる。また金ナノロッドは、分子モーターに対してどのような向きで結合させるかのコントロールが難しいという欠点がある。この欠点については、後述する計測例でさらに詳しく説明する。

金ナノ粒子によるリニア分子モーターキネシン-1の1分子イメージング

キネシン-1は2本の足で歩く分子モーターである。専門的には2つの「頭」

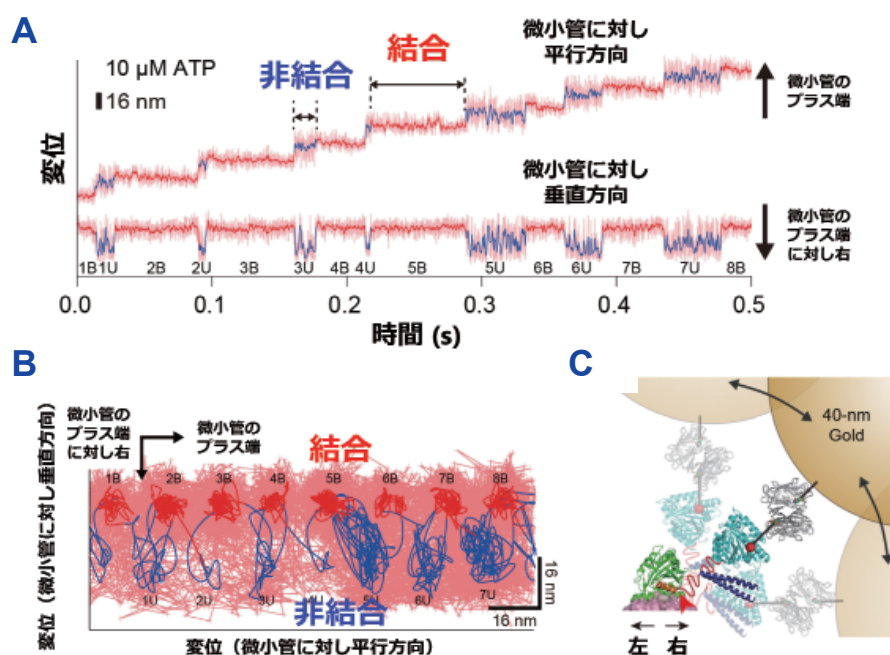


図2 リニア分子モーターキネシン-1の直進運動の1分子イメージング。直径40 nmの金ナノ粒子で標識。時間分解能55 μ s、位置決定精度1 nm。A, 重心位置の時間変化。キネシン-1の足が微小管に結合した状態(結合)を赤で、微小管から解離した状態(非結合)を青で示す。尚、片足のみを標識しており、非標識のもう片足の動きはみえないことに注意されたい。B, 重心位置の時間変化の2次元プロット。微小管からの解離状態(非結合、青)では、進行方向に対し右側で揺らいでいる。C, 進行方向に対して後ろ側からみたキネシン-1と微小管(ピンク)の構造モデル。キネシン-1の「脚」(赤い波線)の付け根(赤い矢じり)は、微小管に結合した足(緑)の右側に位置する。このため立体障害により、微小管から解離した足(シアン)は進行方向に対し右側で揺らぐ。

が正しいが、わかりやすくするため「足」と表現する。キネシンは2本の足を交互に前に踏みだしながら、まるでヒトが歩くように直進運動する。しかし、ナノサイズのキネシンがどのように正確に一方方向に歩くのか、その詳細な仕組みはわかっていない。上述のようにナノの世界では質量は小さく慣性は働かないので、ヒトが歩くように浮かせた足を勢いに任せて前に着地させることはできない。また、キネシンは水中で歩くので、熱運動する周囲の水分子が衝突し、浮いた足はふらふらとブラウン運動をする。よって、キネシンが歩く仕組みはヒトが歩く仕組みとは大きく異なると考えられる。

我々は、粒径40 nmの金ナノ粒子をキネシンの片足に結合させ、その動きを55 μ sの時間分解能と1 nmの位置決定精度で可視化した(図2)^[8]。これにより、レールである微小管から解離した足は実際に、ブラウン運動で激しく揺らぐことが直接示された。しかし予想外なことに、揺らぎは前後左右に

等方的ではなく進行方向に対し右側に偏っていた。キネシンの構造モデルでは、両足を繋ぐ「脚」(ネックリンカー)が微小管に結合した足の右側に位置しているため、立体障害によって浮いた足の揺らぎが右側に偏ると解釈された。尚、この結果は、キネシンは一方方向に回転しながら直進運動を示唆する。ドイツのグループが最近、実際に回転していることを示す論文を出版し、回転の証明は先を越されてしまった。残念である。

また、片足が浮いた状態の持続時間の解析から、微小管に結合した足へATPが結合するのを待つ過程(ATP濃度に依存)、ATP結合後にその足の構造が変化して浮いた足が前に着地する過程(ATP濃度に非依存)の2つの素過程があることが明らかとなった。また、両足を繋ぐ脚にグリシン残基を7個追加して人工的に長くすると、微小管に結合した足へATPが結合するまで片足が浮いた状態を維持することができなくなり、前だけでなく後ろに着地

(足踏み)するようになった。後ろだけでなく左右のレールにも頻繁に着地し(サイドステップ)、酔っ払いの千鳥足のような無駄な動きをみせた。さらに、アミノ酸残基を一つだけ削って脚をちょっと短くすると、正確に一方方向には歩けるが、浮いた足が前に着地するまでに時間がかかるようになり、運動速度が野生型の20%程度に低下した。これらの結果から、2本の足を繋ぐ脚が最適な長さであることが、エネルギーを無駄に消費せずにキネシンが効率的に歩くために重要であることが明らかとなった。

金ナノロッドによる回転分子モーター F₁-ATPase の1分子イメージング

回転分子モーター F₁-ATPase の回転運動を金ナノロッドで観察した例を図3に示す^[7]。この例では、F₁-ATPase の固定子である $\alpha_3\beta_3$ リングをガラス基板に結合させ、回転子である γ サブユニットに金ナノロッド(長軸80 nm、短軸

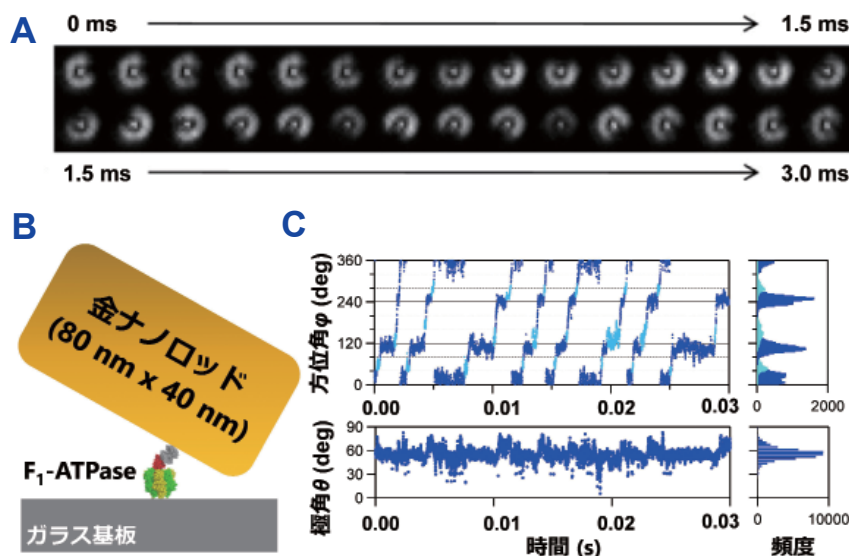


図3 回転分子モーター F₁-ATPase の回転運動の1分子イメージング。長軸80 nm、短軸40 nmの金ナノロッドで標識。時間分解能3.3 μ s、角度決定精度1°。A, 金ナノロッドのデフォーカス像のシークエンス。30枚に1枚ずつ(100 μ s間隔)、間引いて表示。B, 実験系の模式図。F₁-ATPaseの固定子 $\alpha_3\beta_3$ リング(緑と黄)をガラス基板に結合させ、回転子 γ サブユニット(赤)に金ナノロッドを結合させることで回転運動を観察。C, 方位角 ϕ 、極角 θ の時間変化。右には方位角 ϕ 、極角 θ の分布を示す。

40 nm) を結合させることで回転運動を観察している。時間分解能は3.3 μ s、角度決定精度は1°である。金ナノロッドのデフォーカス像を取得することで、1回転中(方位角 ϕ)に6か所の停止位置があることが観察できている。また、回転中の極角 θ の揺らぎも観察できている。

上記でも少し触れたが、金ナノロッドには一つ、指摘しておかないといけない欠点がある。それは、分子モーターに対して金ナノロッドをどのような向きで結合させるかのコントロールが難しい点である。都合の悪い向きに結合した金ナノロッドはモーターの動きを邪魔すると考えられ、都合の良い向きに結合してうまく動いている分子だけが観察できていると考えられる。またこの欠点があるため、プローブの粘性係数を正確に見積もることが困難であり、回転の角速度からF₁-ATPaseが発生するトルクを計測することは容易ではない。他方、高速イメージングにより金ナノロッドの揺らぎが可視化でき

るので、非平衡統計物理学の「揺らぎの定理」に基づく手法を適用することでトルクが計測できる^[9]。この手法により得られたトルクは44 pNnmであり、アクチン線維やポリスチレンビーズをプローブとして粘性係数と回転角速度から求めた値と同程度であった。尚、金ナノロッドの長軸の末端に選択的に表面処理を行う方法が最近開発されており、将来的には上記の欠点は改善できると期待している。

おわりに

我々は今後、金や銀からなるプラズモニックナノプローブを用いた分子モーターの1分子イメージングをさらに発展させたいと考えている。例えば金ナノ粒子と銀ナノ粒子では、プラズモン共鳴のピークの波長が大きく異なる。また、金と銀の合金を用いると、混合比によりプラズモン共鳴のピークの波長をチューニングすることも可能である。これらの特性を利用すれば、複数種の金属ナノ粒子を識別して可視化す

るマルチカラー1分子イメージングが可能になると考えている。また、金属ナノ粒子がダイマーを形成するとプラズモンカップリングによって共鳴波長が長波長シフトし、粒子間の距離がナノメートルレベルで近接するほどシフト量が増加する。この特性を用い、タンパク質の構造変化を高感度に検出する「プラズモンルーラー」を開発したいと考えている。また最近の我々の計測で、金ナノロッドはデフォーカス像でなくフォーカス像でも点像分布関数が若干歪み、この歪みから配向を決定できることが明らかとなった(未発表データ)。フォーカス像を用いると重心位置と配向を同時に決めることができ、分子モーターの運動と構造変化を同時に検出することができる。さらに、ナノ粒子やナノロッドを円偏光で照明することで一方向に強制回転させることができるという報告があり、分子モーターの1分子操作に適用できる可能性がある。今後の展開にご期待頂きたい。

参考文献

- [1] Iino, R., et al., *Single-molecule imaging and manipulation of biomolecular machines and systems*. Biochim Biophys Acta, 2018. **1862**: p. 241-252.
- [2] Ueno, H., et al., *Simple dark-field microscopy with nanometer spatial precision and microsecond temporal resolution*. Biophysical Journal, 2010. **98**(9): p. 2014-23.
- [3] Minagawa, Y., et al., *Basic Properties of Rotary Dynamics of the Molecular Motor Enterococcus hirae V1-ATPase*. J Biol Chem, 2013. **288**(45): p. 32700-7.
- [4] Watanabe, R., et al., *Biased Brownian stepping rotation of F_oF₁-ATP synthase driven by proton motive force*. Nat Commun, 2013. **4**: p. 1631.
- [5] Ueno, H., et al., *Torque generation of Enterococcus hirae V-ATPase*. J Biol Chem, 2014. **289**(45): p. 31212-23.
- [6] Iino, R., et al., *Rotational mechanism of Enterococcus hirae V1-ATPase by crystal-structure and single-molecule analyses*. Curr Opin Struct Biol, 2015. **31**: p. 49-56.
- [7] Enoki, S., et al., *High-speed angle-resolved imaging of a single gold nanorod with microsecond temporal resolution and one-degree angle precision*. Anal Chem, 2015. **87**(4): p. 2079-86.
- [8] Isojima, H., et al., *Direct observation of intermediate states during the stepping motion of kinesin-1*. Nat Chem Biol, 2016. **12**(4): p. 290-7.
- [9] Hayashi, K., et al., *Fluctuation theorem applied to F₁-ATPase*. Phys Rev Lett, 2010. **104**(21): p. 218103.